

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННОГО ВЛИЯНИЯ МЕТРОНИДАЗОЛА МЕТОДОМ АНАЛИЗА ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ.

Витебский государственный университет.
Витебский государственный медицинский
университет.

При изучении цитогенетических показателей на фоне введения метронидазола в низкой, средней и высокой дозах у мышей линии СВА имело место увеличение содержания клеток со структурными и количественными нарушениями в костном мозге. Наблюдаемая тенденция зависела от дозы и длительности введения препарата. Так, достоверное возрастание большинства цитогенетических параметров имело место при дозе 14 мг/кг при введении препарата в течение не менее 5 дней ($p < 0,05$), а также при дозе 21 мг/кг с третьего дня эксперимента.

Индукцированный мутагенез представляет реальную опасность для жизни и здоровья человека, поскольку вновь возникающие мутации оказывают негативное влияние на приспособленность популяции в целом и здоровье пораженного индивидуума в отдельности[1]. Главной мерой борьбы с отрицательными последствиями индуцированного мутагенеза является широкий генетический скрининг, проводимый с целью выявления потенциально мутагенных агентов[6]. Проблема изучения генотоксического воздействия химических и физических факторов окружающей среды находится в центре внимания исследователей[10].

Важно отметить, что даже при обнаружении отдельных лекарственных препаратов или других ксенобиотиков мутагенных эффектов от применения некоторых из них невозможно отказаться по медицинским или экономическим соображениям[7].

Одним из часто используемых препаратов, обладающих широким спектром действия в отношении патогенных про-

стейших, является производное нитроимидазола - метронидазол[2]. По данным ряда авторов как в клинике, так и в эксперименте этот препарат характеризуется высокой эффективностью против кишечных простейших[3]. В частности, при лечении лямблиоза метронидазол показывает высокий лечебный эффект, а также является активным ингибитором этих простейших в культуре[4].

При рассмотрении случаев устойчивости лямблий к метронидазолу установлено, что это может быть связано с токсическим действием препарата на клетки хозяина, проявляющееся мутагенным эффектом в виде хромосомных перестроек и изменений повторяемости фрагментов ДНК[5].

В связи с этим, целью нашей работы является изучение влияния метронидазола на возможную мутагенную активность в зависимости от дозы и срока введения препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В соответствии с рекомендациями Московского НИИ гигиены им. Ф.Ф.Эрисмана по определению мутагенных и бластомогенных свойств новых химических веществ, был использован метафазный метод на клетках костного мозга мышей линии СВА [9]. В каждую группу контроля и опыта входило по 5 лабораторных животных массой 16-18 г, которые находились в одинаковых условиях и на стандартной диете. Мышам из групп контроля метронидазол вводился в суточных(однократных) дозах из расчета 7, 14 и 21 мг/кг массы тела животного. Первая группа животных получала препарат однократно, вторая - на протяжении трех, третья - пяти, четвертая - семи и пятая десяти дней. Убой проводился соответственно номерам групп на 1, 3, 5, 7 и 10 дни наблюдения. Группам контрольных животных вводилось плацебо по аналогичной схеме.

Препараты кариотипов клеток костного мозга мышей готовили по методике, предложенной Г.Мак-Грегор и Дж.Варли [12] в модификации Е.Н.Р.Форд и

D.H.M.Woollam [8] с учетом рекомендаций, предложенных Российским НИИ гигиены им. Ф.Ф.Эрисмана [9]. За полтора часа до убоя всем группам мышей внутрибрюшинно вводили 0,05% водный раствор колхицина фирмы Мегс из расчета 0,01 мл/г массы тела животного. Животных убивали путем растяжения спинного мозга. Бедренные кости обеих конечностей извлекали из тушки, освобождали от мягких тканей и срезали эпифизы. Костный мозг вымывали в центрифужные пробирки 1% раствором цитрата натрия, предварительно подогретого до 37° С. Пробирки с полученной клеточной взвесью помещали в водяную баню при температуре 37° С на 30 минут, затем центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали. К осадку добавляли 2 мл фиксатора (3 части метилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты). Осадок тщательно перемешивали до получения однородной взвеси. Пробирки ставили в холодильник на 60 минут с последующим центрифугированием 5 минут при 1000 об/мин и трехкратной сменой фиксатора. Завершив фиксацию к осадку добавляли 0,5 мл фиксатора и взвесь, после тщательного встряхивания, раскапывали пастеровской пипеткой на обезжиренные, охлажденные и влажные предметные стекла с высоты 30-40 см. Далее производили выжигание фиксатора над горелкой с последующим высушиванием стекол на воздухе. Препараты окрашивали азури-эозином (2 части 1% эозина, 3 части 0,1% азури, 5 частей дистиллированной воды и добавлением 0,2 мл 0,1% карбоната натрия на каждые 20 мл красителя) в течение 15-20 минут с последующим промыванием стекол проточной водой. От каждого животного анализировали не менее 100 метафазных пластин. При анализе препаратов учитывали число клеток с абберациями, гипоплоидных клеток, гиперплоидных клеток и митотический индекс. Все полученные данные заносили в стандартные протоколы, предложенные ВОЗ для цитогенетического мониторинга[14]. Препараты анализировались на микроскопе Laboval (Karl Zeiss Jena) при увеличении 1000х с учетом рекоменда-

ций по оценке хромосомных перестроек, предложенных Л.С.Немцевой[15].

Статистическая и графическая обработка полученных данных проводилась по стандартной схеме[13] при помощи программ Word 7,0 и Excel 7,0 на компьютере Pentium 100.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что у животных из группы опыта, получавших препарат в дозе 7 мг/кг массы тела при однократном введении процент абберрантных клеток составлял $1,5 \pm 0,5\%$, гипоплоидных - $1,7 \pm 0,3\%$, гиперплоидных - $0,4 \pm 0,1\%$ и митотический индекс - $3,5 \pm 0,3\%$. При введении препарата на протяжении трех дней число клеток с абберациями было равно $1,7 \pm 0,5\%$, гипоплоидных - $1,7 \pm 0,5\%$, гиперплоидных - $0,4 \pm 0,2\%$ и митотический индекс - $3,8 \pm 0,7\%$. На фоне введения препарата в течение пяти дней показатель абберрантных клеток равнялся $2,0 \pm 0,4\%$, гипоплоидных - $1,8 \pm 0,4\%$, гиперплоидных - $0,5 \pm 0,2\%$ и митотический индекс - $3,8 \pm 0,8\%$. Мыши, получавшие препарат на протяжении 7 дней, имели уровень абберрантных клеток $2,0 \pm 0,7\%$, гипоплоидных - $2,1 \pm 0,5\%$, гиперплоидных - $0,6 \pm 0,1\%$ и митотический индекс - $4,0 \pm 0,5\%$. После введения метронидазола в течение 10 дней процент клеток с абберациями составлял $2,1 \pm 0,5\%$, гипоплоидных - $2,1 \pm 1,2\%$, гиперплоидных - $0,6 \pm 0,2\%$ и митотический индекс - $4,1 \pm 0,5\%$.

Животные из группы опыта получавшие препарат в дозе 14 мг/кг массы тела при однократном введении, имели процент абберрантных клеток - $1,7 \pm 0,7\%$, гипоплоидных - $1,8 \pm 0,5\%$, гиперплоидных - $0,4 \pm 0,2\%$ и митотический индекс - $3,8 \pm 0,5\%$. При введении препарата на протяжении трех дней число клеток с абберациями было равно $2,2 \pm 0,2\%$, гипоплоидных - $2,1 \pm 0,7\%$, гиперплоидных - $0,5 \pm 0,1\%$ и митотический индекс - $4,0 \pm 0,3\%$. На фоне введения препарата в течение пяти дней показатель абберрантных клеток равнялся $2,5 \pm 0,5\%$, гипоплоидных - $2,4 \pm 0,5\%$, гиперплоидных - $0,6 \pm 0,2\%$ и митотический

индекс - $4,2 \pm 0,5\%$. Мыши, получавшие препарат на протяжении 7 дней, имели уровень аберрантных клеток $2,5 \pm 1,2\%$, гипоплоидных - $2,5 \pm 0,5\%$, гиперплоидных - $0,6 \pm 0,3\%$ и митотический индекс - $4,5 \pm 0,3\%$. После введения метронидазола в течение 10 дней процент клеток с абберациями составлял $2,8 \pm 0,7\%$, гипоплоидных - $2,8 \pm 0,4\%$, гиперплоидных - $0,7 \pm 0,2\%$ и митотический индекс - $4,7 \pm 0,5\%$.

У животных из группы опыта, получавших препарат в дозе 21 мг/кг массы тела при однократном введении, процент аберрантных клеток составлял $1,7 \pm 1,1\%$, гипоплоидных - $1,7 \pm 0,5\%$, гиперплоидных - $0,5 \pm 0,1\%$ и митотический индекс - $4,0 \pm 0,2\%$. При введении препарата на протяжении трех дней число клеток с абберациями было равно $2,4 \pm 0,3\%$, гипоплоидных - $2,0 \pm 0,2\%$, гиперплоидных - $0,6 \pm 0,2\%$ и митотический индекс - $4,2 \pm 0,5\%$. На фоне введения препарата в течение пяти дней показатель аберрантных клеток равнялся $2,7 \pm 1,3\%$, гипоплоидных - $2,7 \pm 0,8\%$, гиперплоидных - $0,6 \pm 0,3\%$ и митотический индекс - $4,5 \pm 0,7\%$. Мыши, получавшие препарат на протяжении 7 дней имели уровень аберрантных клеток $3,0 \pm 0,5\%$, гипоплоидных - $3,1 \pm 1,2\%$, гиперплоидных - $0,7 \pm 0,1\%$ и митотический индекс - $4,7 \pm 0,5\%$. После введения метронидазола в течение 10 дней процент клеток с абберациями составлял $3,5 \pm 1,1\%$, гипоплоидных - $3,6 \pm 1,0\%$, гиперплоидных - $1,1 \pm 0,3\%$ и митотический индекс - $4,9 \pm 1,2\%$.

Животные из группы контроля, получавшие плацебо однократно имели процент аберрантных клеток, равный $1,5 \pm 0,2\%$, гипоплоидных - $1,7 \pm 0,5\%$, гиперплоидных - $0,4 \pm 0,2\%$ и митотический индекс - $3,5 \pm 0,2\%$. При введении на протяжении трех дней число клеток с абберациями было равно $1,3 \pm 0,5\%$, гипоплоидных - $1,7 \pm 0,3\%$, гиперплоидных - $0,4 \pm 0,1\%$ и митотический индекс - $3,3 \pm 0,5\%$. На фоне введения плацебо в течение пяти дней показатель аберрантных клеток равнялся $1,5 \pm 0,3\%$, гипоплоидных - $1,7 \pm 0,2\%$, гиперплоидных - $0,3 \pm 0,2\%$ и митотический индекс - $3,5 \pm 0,2\%$. Мыши, получавшие плацебо на протяжении 7 дней, имели уро-

вень аберрантных клеток $1,5 \pm 0,2\%$, гипоплоидных - $1,6 \pm 0,5\%$, гиперплоидных - $0,4 \pm 0,1\%$ и митотический индекс - $3,7 \pm 0,4\%$. После введения мнимого лекарства в течение 10 дней процент клеток с абберациями составлял $1,4 \pm 0,3\%$, гипоплоидных - $1,7 \pm 0,5\%$, гиперплоидных - $0,4 \pm 0,1\%$ и митотический индекс - $3,5 \pm 0,5\%$.

Таким образом, у животных контрольных групп на протяжении всего периода наблюдения колебания цитогенетических показателей не имели достоверного характера ($p > 0,05$). Животные из групп опыта характеризовались тенденцией к повышению ряда показателей в зависимости от дозы и срока введения препарата. Так, достоверное возрастание большинства цитогенетических параметров имело место при дозе 14 мг/кг при введении препарата в течение не менее 5 дней ($p < 0,05$), а также при дозе 21 мг/кг с третьего дня эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дубинин Н.П. Новое в современной генетике. -М.: Наука, 1986. -206 с.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. -М.: Медицина, 1984. -с.343-345.
3. Wurbs D., Classen M. *Lambliia intestinalis* als krankheitserreger//Dtsch. Med. Wochenschr., 1979. -104. -N33. -P.1156 - 1157.
4. Gordts Bart, Hemelhof Wim, Asselman Chantal, Butzler Jean-Paul. In vitro susceptibilities of 25 *Giardia Lamblia* isolates of human origin to six commonly used antiprotozoal agents//Antimicrob. Agtns and Chemother., 1985. -28. -N3. -P.378-380.
5. Upcroft J.A., Upcroft P., Boreham P.F.L. Drug resistance in *Giardia intestinalis*//Int. J. Parasitol., 1990. -20. -N4. -P.489-496.
6. Середенин С.Б., Дурнев А.Д. Фармакологическая защита генома. -М.: ВИНТИ, 1992. -162 с.
7. Бочков Н.П., Шрамм Р.Я., Кулешов Н.П. Система оценки химических веществ на мутагенность для человека: Общие принципы, практические реализации и дальнейшие разработки//Генетика, 1975. -N10. -С.157-168.

8. Ford E.H.R., Woollam D.H.M. A study of the mitotic chromosomes of mice of the strong A line//Experimental Cell Research, 1963. -Vol.32. -N2. -P.320-326.
9. Определение мутагенных и бластомогенных свойств новых химических веществ//Метод. рекомендации. - Под ред. А.П.Шицковой. -Москва, 1983. - 22 с.
10. Степанов А.В. Влияние трихоцефалезной инвазии и метаболитов паразита на кариотип соматических клеток хозяина//Дисс. на соискание уч. степени канд. мед. наук. -Витебск, 1995. -165 с.
11. Кириллов В.М., Степанов А.В. Изучение сочетанного влияния терапии метронидазолом и феназепамом на показатели микроядерного теста при экспериментальном лямблиозе мышей//Теоретические и практические аспекты медицины. -Сб. науч. трудов. -Витебск, 1998. -С.151-153.
12. Мак-Грегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных. -М.: Мир, 1986. -286 с.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия. -М.: Высшая школа, 1990. -352 с.
14. Немцева Л.С. Метафазный метод учета перестроек хромосом. -М.: Наука, 1970. -

106 с.

15. Methods for the analysis of human chromosome aberrations//Edited by K.E.Bucton & H.J.Evans. -WHO, Geneva, 1973. -235 p.

SUMMARY

A.V.Stepanov, A.G.Zaharenko.

DETERMINATION OF MUTAGENIC EFFECT OF METRONIDAZOLE BY CHROMOSOM ABBERATIONS ANALYSIS.

When studing the citogenetic indexes during introduction of metronidazole at minimal, middle and maximal dosages to the mice CBA the increase of cells with structural and qualitative disturbances of chromosomes in the bone-marrow cells took place. These disturbance depended upon the dosage and duration of drug introduction. So, reliable increasing of the most cytogenetic parameters took place with the dose of 14 mg/kg on the 5th day of introduction ($p<0.05$), and also with the dose of 21 mg/kg on the 3rd day of experiment.